

マウスの *S. blegdam* 感染に対する免疫

生菌を含めぬワクチンによる免疫及び S 型生菌免疫について*

植竹久雄 永井龍夫
小池 皓 中川武彌

札幌医科大学微生物学教室 (主任 植竹教授)

Immunization of Mice against Infection with *Salmonella Blegdam*

Immunization with Vaccines Containing no Living Organism and that
with Living Smooth Organisms of Heterologous *Salmonellas*

By

HISAO UETAKE, TATSUO NAGAI, AKIRA KOIKE
and TAKEYA NAKAGAWA

Department of Microbiology, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. H. UETAKE)

I まえおき

前報において植竹等¹⁾はマウスの *S. blegdam* による感染は *S. blegdam* の R 型生菌 (完全な R 型ではない) のみならず他の *Salmonella* 即ち heterologous *Salmonella* の R 型生菌 (完全な R 型菌) 例えば *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. newington* 等の R 型生菌によつても防禦出来るが死菌ワクチンでは, *S. blegdam* S 型菌から作製したものでも, 同菌 R 型菌から作製したものでも, 少なくともわれわれの用いた範囲内では, 死期は延長するが致命率の低下をもたらすことは出来なかつたことを報じた。

異種 *Salmonella* としては上記の菌種の外に *S. typhi*, *S. london* の R 型生菌も用いたがこれ等の菌では *S. blegdam* に対する感染防禦を興えるこ

とは出来なかつた。この 2 者は共にマウスにいわゆるチフス性疾患を起さぬ菌であるのに, 前記の *S. enteritidis* や *S. dublin* はマウスにチフス性疾患を起す菌であることに先ず注意がひかれる。一体それ自体チフス性疾患を起さぬ菌を以てしてはチフス性疾患に対する感染防禦を興えられないのであろうか? このことは一つの問題であり, このことに関しては別報に報告する筈である。

また生菌を含めぬワクチンでチフス性疾患に対する免疫が興えられないのであろうか? 小林氏等²⁾の一連の研究成績は正に「興えられない」と報じ, われわれの前報の報告もこれに一致するものであつた。しかし他面, 生菌免疫と死菌免疫の差は單に量的問題にすぎないとの見解をとる学者もあるのであつて, この様な立場をとる人は当然の考えとして「抗原を十分多量にかつ長つづきする」様

* この報告の内容は第 24 回日本細菌学会総会 (昭和 24 年 4 月); 第 3 回日本細菌学会北海道支部会 (昭和 26 年 3 月); 第 27 回北海道医学会大会 (昭和 26 年 6 月); 抗原抗体班研究協議會 (昭和 26 年 3 月) において発表されたものである。また本研究には文部省科学研究費の援助を受けた。

1) 植竹・松宮・田村・小原・前川・中川: 札幌医紀要, 1, 27

(昭 25).

2) 小林: 診療大綱, 2, 1 (昭 8); 臨床の日本, 12, 50 (昭 8-9); 日医健保, 3240-3252, 1745, 1803, 1871, 1929 (昭 16); 同誌, 3266, 81 (昭 17); 同誌, 3360-3361, 3, 61 (昭 19).

牛場: 日本医学, 3421, 97 (昭 23).

に與えれば死菌を以てしても生菌免疫同様の免疫が成立する筈と考えている。細谷教授³⁾はこの立場をとり、氏の考案したワクチン (TAT ワクチン或いは TTT ワクチン) を以てすれば生菌免疫に相当するほどの感染防禦力を與えることが可能であると主張している。(安東教授のクロームワクチンは本報告の研究の行われた頃にはまだ現われていなかった。)これは重要なことであるのでわれわれも当然この追試を行つてみた。

更に細谷教授の主張でもう一つ重要な点は TT T 或いは TAT ワクチン免疫を施すと攻撃菌の体内侵入が阻止されるという点である。「R 型生菌免疫では攻撃菌の体内侵入は阻止出来ないが侵入した菌の増殖を抑制する様に作用する」というのが小林氏一門の結論であり、われわれの実験成績もこれを支持したのであるが、だとすれば異なる感染防禦機轉の存在することも疑つてかかる必要がある。ここに第 3 の問題がある。

これ等の問題について行われた実験成績を本報告については述べることにする。

II 実験材料及び実験方法

1. 攻撃菌株：前報と同じく Bl_3 S 株^{1),4)}を用いた。マウス (13~15 g) 腹腔内接種による最少致死量は 10^{-8} mg である。

2. 免疫に用いた菌株

a) *S. enteritidis* 1891, *S. dublin* 215, *S. rostock*, *S. new-brunswick* 5411, *S. typhi* murium 1406 は何れもサルモネラ委員会 (現在は腸内細菌委員会) により分與された菌株を用いた。

b) 各菌株をそれぞれ抗血清加ブイオン培養してそれぞれの R 型菌を得た。*S. enteritidis* 1891 株から 64 R₁ 株, *S. dublin* 215 株から 65 R₁ 株を得た。これ等の R 型菌株は総て諸種性状検査により R 型と判定されるものである。(これについては前報¹⁾ 参照)。

3. 感染防禦試験

マウスは 13~15 g のものを用いた。

免疫方法は各実験のところ述べる。最後の免疫処置終了後 7 日乃至 28 日後に Bl_3 S 株 2 mg 径口投與により攻撃し、その後 1 ケ月間観察をつづけ、死亡したマウスはすべて解剖、培養して感染死か否かを確めた。1 ケ月後にな

お生残つていたマウスは撲殺し、各臓器から培養により菌を検索した。菌の培養は総て直接遠藤培地或いは Drigalski 変法培地に塗抹する外、胆汁培地による増菌をも併用した。胆汁培地は臓器片を投入して 37°C に 3 日間おいた。なお S 型生菌免疫実験の場合の菌の分離培養は普通の遠藤培地或いは Drigalski 変法培地では免疫に用いた菌株と攻撃に用いた菌株を鑑別出来ない (血清学的に個々の集落を検査しても鑑別可能ではあるが煩雑である) ので、この様な場合には免疫用菌株と攻撃用菌株を比較して、その一方が分解し他方が分解しない様な炭水化物を選んでこれを乳糖の代りに加えた遠藤培地或いは Drigalski 培地を用いる様にした。

4. 生菌を含めぬワクチンの作り方

a) TAT ワクチン：攻撃用菌株 Bl_3 S 株を用い、細谷教授記載³⁾の方法に従つて作つた。なるべく記載とおりに行い、加圧透析のところを加圧せずに透析膜 (豚の膀胱を用いた) を出来るだけ固く結んで、透析にかけたところが異なるだけである。

b) 肝 TAT ワクチン：家兎肝片を無菌的に加えたブイオンに Bl_3 S 株を培養し、TAT ワクチンと同様の方針で細谷教授の方法によつて作つた。

c) 明禁菌体ワクチン：TAT ワクチンに準じて作つたもので、菌体を除かずに死菌体も共に含めて作つたもの。

d) Bl_1 R₄ 明禁菌体ワクチン： Bl_1 R₄ 株を家兎睾丸内に接種し、5 日目前後にこれを剔出生理的食鹽水で 10% 乳劑とし、凍結融解を数回繰返し、その遠沈上清に Toluol を加えて殺菌し、以下 (c) のワクチンの製法に従つて処理を進め、死菌体も含めた形で、ワクチンとした。

e) 64R₁ 明禁菌体ワクチン：*S. enteritidis* の R 型 64R₁ 株を用いて Bl_1 R₄ 株と同様の方法でつくつたワクチン。

これ等のワクチンは何れも生菌を含めぬことを予め確めてから使用した。

III 実験成績

A. TAT 及びそれに類するワクチンによる免疫の試み
細谷教授記載の方法に従つて Bl_3 S 株ブイオン培養から作つた TAT ワクチンの外に肝 TAT ワクチン、明禁菌体ワクチン、 Bl_1 R₄ 明禁菌体ワクチン、64R₁ 明禁菌体ワクチンをも用いて、感染防禦試験を行つた。その成績を一括したのが第 1 表である。

最初行われた実験は第 1 表の①⑥⑦⑧である。TAT ワクチンを作るのは始めてなので出発材料をいろいろかえて

3) 細谷：基礎と臨床, 2, 33 (昭 23); 臨床, 2, 355 (昭 24); 同誌, 3, 901 (昭 25); 日本臨床, 8, 473, 567 (昭 25)。

4) 植竹・松宮・小谷・向後：新臨床, 2, 147 (昭 23)。

みた。TAT ワクチンに更に菌体も加わつた明禁ワクチンも作つて比較を試み、更に生体内感染の時に感染防禦抗原の出現を期待して⁵⁾ 64R₁ 株及び Bl₁R₄ 株を家兎睾丸に接種し、これを剔出して作つた明禁菌体ワクチンも試みてみた。しかしその成績は芳しくなく動物は全部死亡し、生存日数延長さえ明かに出来なかつた。即ちワクチン接種により感染防禦は全く認められなかつた。

最初の実験ではワクチンの毒性を恐れて、比較的少量用いたので、今度は量を増してワクチンを接種してみた。^② ④がその実験で、肝 TAT ワクチンについても同時に実験を行つた。ワクチンは何れも新しく作り直したものである。TAT ワクチンは原液 0.2cc 宛皮下に 7 日おきに 2 回接種

し肝 TAT ワクチンも同様に接種した。肝 TAT ワクチン接種群ではワクチンの毒性強くマウスの斃死が多いので攻撃までの日数を 28 日に延ばして様子を伺つたのであるが、遂に 30 頭中 26 頭犠牲となり僅かに 4 頭しか攻撃に用い得なかつた。TAT ワクチン接種群の攻撃も少くおくらせて 14 日後とした。その成績は第 1 表に見るとおりで、肝 TAT 免疫群は 4 頭すべて死亡し、TAT 免疫群は 16 頭中 2 頭が 1 ケ月後までは生残つた。この中 1 頭では肝、脾、腎、腸間膜リンパ節の全てから攻撃菌が証明され、確かに攻撃菌に抵抗したことが知られたが、他の 1 頭では剖検上肝、腸間膜リンパ節に特別の所見なく、脾も殆んど正常と同じ位であり、培養上何れの臓器からも攻撃菌が証明されなかつた。

第 1 表

| 免 疫 原 | 免疫中の マウス 犠牲数 | マウスの 轉 帰 | | | 対 照 | 生 残 マウス の保菌 | 母集団平均生存 日数の信頼限界 (信頼度 95%) |
|---------------------------------------|--------------------|----------|----|------------------|------|-------------------|---------------------------------|
| | | 生 | 死 | 有 の 意 差 | | | |
| ① T A T | 4/20 | 0 | 16 | ○ | 0/5 | | 7.660 ≤ m ≤ 12.340 |
| ② T A T | 13/30 | 2 | 14 | | 0/13 | + | 7.879 ≤ m ≤ 13.721 |
| ③ T A T | 1/30 | 1 | 28 | | 0/10 | + | 9.635 ≤ m ≤ 11.564 |
| ④ 肝 T A T | 26/30 | 0 | 4 | | | | 8.097 ≤ m ≤ 13.903 |
| ⑤ 肝 T A T | 3/31 | 1 | 27 | | 0/10 | + | 9.314 ≤ m ≤ 12.286 |
| ⑥ 明 禁 菌 体 | 5/20 | 0 | 15 | | 0/5 | | 6.111 ≤ m ≤ 7.639 |
| ⑦ 64R ₁ 明禁菌体 | 0/20 | 0 | 20 | | 0/5 | | 7.577 ≤ m ≤ 10.123 |
| ⑧ Bl ₁ R ₄ 明禁菌体 | | 0 | 5 | | 0/5 | | |
| 対 照 | | | | | 0/90 | | 7.202 ≤ m ≤ 7.958 |

免 疫 方 法

| | | |
|---------------------------------------|--|----|
| ① T A T | T: 皮下 0.1 (1:10) → 7H cc 0.1 (1:5) → 7H cc 0.1 (1:2) → 10H | 攻撃 |
| ② T A T | T: 皮下 0.2 (原液) → 7H → 7H → 20H | 攻撃 |
| ③ T A T | T: 皮下 0.2 (原液) → 7H → 14H | 攻撃 |
| ④ 肝 T A T | T: 皮下 0.2 (原液) → 7H → 28H | 攻撃 |
| ⑤ 肝 T A T | T: 皮下 0.2 (1:5) → 10H → 14H | 攻撃 |
| ⑥ 明 禁 菌 体 | 皮下 0.1 (1:10) → 7H → 7H → 10H | 攻撃 |
| ⑦ 64R ₁ 明禁菌体 | 皮下 0.1 (1:10) → 7H → 7H → 10H | 攻撃 |
| ⑧ Bl ₁ R ₄ 明禁菌体 | 皮下 0.1 (1:10) → 7H → 7H → 10H | 攻撃 |

5) 中村：日新医学臨時特増刊号，530 (昭 16)；血液学討議会報告，3，213 (昭 25)；水谷：北海道医誌，19，1972 (昭 16)；Cromartie, W. J., Bloom, W. L. & Watson, D. W.: J. infect. Dis., 80, 1 (1947)；Cromartie, W. J., Bloom, W. L., Watson, D. W. & Heckly, R. J.: Ibid., 80, 14 (1947)；Watson, D. W., Cromartie, W. J., Kegels, G. & Heckly, R. J.: Ibid.,

80, 28 (1947)；Bloom, W. L., Watson, D. W., Cromartie, W. J. & Freed, M.: Ibid., 80, 41 (1947)；Watson, D. W., Cromartie, W. J., Heckly, R. J., McGhee, W. J. & Weissman, N.: Ibid., 80, 121 (1947)；Bloom, W. L., McGhee, W. J., Cromartie, W. J. & Watson, D. W.: Ibid., 80, 137 (1947)；Heckly, R. J. & Goldwasser, E.: Ibid., 84, 92 (1949)。

つた。この例で攻撃菌が侵入しなかつたのか、侵入後殺されたのか、何かのあやまりで攻撃菌が投與されなかつたのか（この様なことはあるまいと思うが、人間のすることであるから間違がないとはいえない）3の可能性があるので、これだけで何れともいえない。一應感染に抵抗したものとして扱うと16例中2例生残ということになる。この割合はあまり芳しい成績ではなくてTATが有効か否かを判定するには困難を感じさせる数字である。この実験の時の無処置対照マウスは13頭で勿論全部感染死亡しているが、この対照との比較では推計学上（無相関検定法による）^{6),7)}有意の差ありとはいえない。しかしわれわれがこれまでの実験で用いて来た対照マウス90頭が全部死亡しており（前報のドイツ系の場合は特別の例で、マウスの系統が異なるから除外する）かつそれが皆同じ条件で扱われたマウスである。われわれは経済的な理由から個々の実験には比較的少数の対照しかおかないけれども、こうした長期に亘る実験から総合して考えてみるとつと多数の対照をおいても当然全部死亡するであろうと想像出来るのは、あなたが著者ばかりではあるまいと思う。そこで試みに90頭を対照として推計学的に計算してみると2.15%の危険率で有意の差ありといえることになる。即ち対照を多くとれば有意の差を認め、少くとも有意の差を認めないことになるのであつて、この点でもいわば境界線附近のデータということになり、はつきりした断定は難しいことになる。

また一方攻撃菌の侵入を阻止するかどうかの点も2頭の中1頭には菌が証明されているから、何れともいえないことになる。

そこで同一ワクチンを用いて再度実験を繰返してみたのが第1表③⑤の成績であつて、両群共1頭宛生残りマウスがあるが、推計学的に対照に比べ有意の差ありとはいえない（対照を90頭としても同様）。また生残りマウスを屠殺検査すると、共に攻撃菌が証明され、侵入を阻止するとはいえない。

即ちなるべく忠実に細谷教授の方法に従つてTATワクチン或いはそれに類するワクチンを作つて、その免疫効果をしらべてみたのであるが、感染防禦効果を確実に断言出来るほどのよい成績は得られなかつたし、またそれだけに生残りマウスも少なく、その少ない生残りマウスでの検査では攻撃菌の体内侵入を阻止すると思われる成績は得られなかつた。但し生存日数の延長は認められた（第1表参照）。

しかしワクチンの作り方というものは、殊に特殊の方法によるものほど、そう簡単に追試出来ないであろうということも考えなければならない。従來のホルマリンワクチンでは1頭も救い得なかつたのに、TATワクチンにより、

たとえばつきりと有意の差を示すとははやくなくとも、1頭でも生残る様になつたのは1歩の前進であるといわなければならぬが、それにしてもわれわれの作つたワクチンがまだ細谷教授等のワクチンに及ばないため成績が芳しくないのかも知れない。

B. S型生菌免疫実験

この様にワクチンの作り方議論の余地があるので、われわれはもう1つの手段として攻撃菌の体内侵入阻止の問題を別のルートから攻究してみることにした。その考え方はこうである。S型菌から作つたワクチン（生菌を含めぬ）で免疫して攻撃菌の体内侵入を阻止し得るのなら、S型生菌で免疫した場合にも同様の機轉が観察されてもいい筈である。（R型生菌免疫では攻撃菌の体内侵入は阻止されないものであるから、もし上の事実が証明されれば2つの免疫機轉が存在することになる）。この様な考えでS型生菌免疫実験を企てた。

免疫原としてのS型生菌としては攻撃に用いるBl₃S株そのものは使用出来ない（何故なら攻撃菌と免疫菌とを区別出来ない）から、heterologous *Salmonella* を用いることにした。使用した菌株は *S. dublin* 215, *S. enteritidis* 1891, *S. rostock*, *S. new-brunswick* 5411, *S. typhi* murium 1406 株で何れもS型生菌を以て免疫したのであるが、*S. dublin* 215, *S. enteritidis* 1891, *S. rostock* の3者はまずR型生菌免疫を施した後S型生菌を與えて免疫を施す様にした。

1. *S. dublin* S型生菌免疫実験

S. dublin 215 株から得たR型菌65R₁ 株⁷⁾ 10⁻³mgをマウス腹腔内に接種して免疫しておき、次いで10日後にS型菌10⁻⁵mgを腹腔内接種してS型生菌免疫とした。初めの65R₁ 株接種による犠牲は3頭、*S. dublin* S型生菌接種による犠牲は4頭で残りの29頭は上記の免疫の操作に耐えることが出来た。

S型生菌免疫処置後24日後にBl₃S株を2mg径口的に投與攻撃した。攻撃後2日後、4日後、6日後に5頭宛屠殺して攻撃菌の侵入如何をしらべた。

菌検索には免疫に用いた菌を鑑別する必要がある。*S. dublin* (IX, XII, g. p...) と *S. blegdam* (IX, XII, g. m. q...) とは抗原構造からも鑑別出来るが、集落を一つ一つしらべるのは非常に手数がかかる。そこで生化学的性状の差を利用して両者を簡単に鑑別し、しかる後血清学的にこれを確かめるという方法をとつた。即ちArabinoseを*S. dublin* 215株は1~2日では分解せず、*S. blegdam* は分解するので、乳糖の代りにArabinoseを加えた遠藤培地⁸⁾ 或いはDrigalski 變法培地を用いて両者を鑑別分離培養した。

6) 佐藤(良): 無相関検定法(昭24)。

7) 佐藤(謙): 平均値と百分率(昭23)。

第2表 *S. dublin* S型生菌免疫マウスにおける攻撃菌侵入状況

| 屠殺 日 後 | マウス番号 | 培 | | | | | 養 | | |
|--------------|-------|-----|----|----|----|----|---------------|-----|-------------|
| | | 心 血 | 肺 | 肝 | 脾 | 腎 | 腸 間 膜 リンパ節 | 腸内容 | 頸 部 リンパ節 |
| 2 日 後 | 6516 | — | ⊕× | ⊕× | ⊕× | ⊕× | ⊕× | — | ⊕⊖ |
| | 17 | — | ⊕⊗ | ⊕× | ⊕× | ⊕× | + | — | ⊕× |
| | 18 | — | ⊕⊗ | ⊕× | + | ⊕× | + | — | ⊖× |
| | 19 | × | ⊕× | ⊕× | ⊕× | ⊕× | ⊕× | — | ⊖× |
| | 20 | — | ⊕ | ⊕× | ⊕× | ⊕× | ⊕× | — | × |
| 4 日 後 | 6521 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 22 | + | + | + | + | + | + | + | ⊖ |
| | 23 | — | ⊕ | + | + | + | + | — | ⊕ |
| | 24 | — | ⊕⊗ | + | + | + | + | — | ⊕ |
| | 25 | — | ⊗ | + | + | + | + | — | + |
| 6 日 後 | 6526 | — | ⊕ | ⊕ | + | ⊕ | + | — | ⊕ |
| | 27 | — | + | + | + | + | + | + | ⊕ |
| | 28 | — | + | + | + | + | + | — | ⊕ |
| | 29 | — | + | + | + | + | + | — | ⊕ |
| | 30 | — | ⊕ | + | ⊕ | ⊕⊗ | ⊕ | — | ⊕ |

註 + : *Bl₃* S株が直接分離培養で証明されたことを示す。

× : *S. dublin* S型が直接分離培養で証明されたことを示す。

⊕及び⊗ : 胆汁培地増菌後それぞれ *Bl₃* S株或いは *S. dublin* S型が証明されたことを示す。

その成績は第2表に示すとおりであつて、2日目、4日目、6日目何れの日にも屠殺したマウスからもすべて攻撃に用いた *Bl₃* S株が直接培養または増菌後証明されている。しかも残りのマウスの中感染死で斃れたのは4頭で他は1ヶ月以上も生残つたから免疫が成立してなかつたために菌が侵入したわけではあるまい。65R₁株によつても確実に免疫が成立しているから（前報）その点からみてもこの考え方に無理はあるまい。するとやつぱり攻撃菌の体内侵入を阻止出来なかつたと見るのが妥当である。また他面免疫に用いた *S. dublin* S型菌もかなり多数のマウスに証明されているからS型生菌免疫が成立していなかつたわけでもないと思われる。

結局 *S. dublin* S型生菌免疫を以てしても攻撃菌の体内侵入阻止は証明されないで増殖抑制的に作用するものと解される。

2. *S. enteritidis* S型生菌免疫実験

S. enteritidis 1891株から得たR型菌64R₁株 10^{-3} mgをマウス腹腔内に接種して免疫しておき、次いで14日後にS型生菌 10^{-6} mgを腹腔内接種してS型生菌免疫とした。S型生菌免疫を施したマウス26頭中12頭が斃死し（一部は原因不明の死）、残り14頭にS型生菌接種後17日後に $Bl_3 S_8$ 株2mg経口投與攻撃した。

その成績は第1図に示すとおりで対照マウス12頭は4日乃至14日の間に全部死亡したが、*S. enteritidis* S型生菌免疫群では4頭が30日後まで生残つた。生存マウスを30日目に屠殺して滞菌状態をしらべたのが第3表のマウス番号6432~6435である。即ち何れのマウスからも攻撃菌

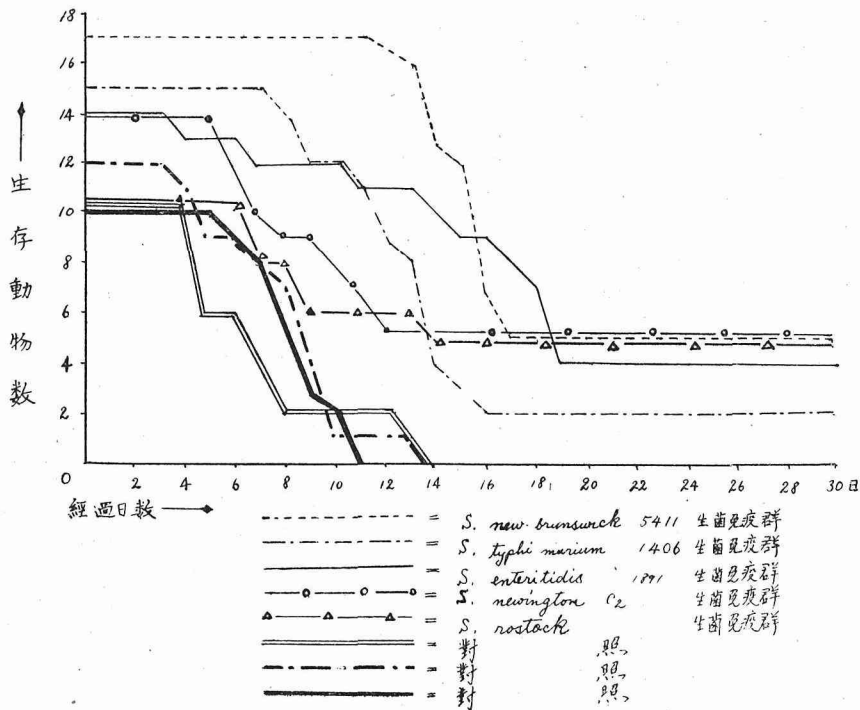
株が証明されたのであつて、攻撃菌の侵入は阻止されていない。やはり増殖抑制と解される。菌検索には免疫に用いた *S. enteritidis* と攻撃に用いた *S. blegdam* を鑑別する必要がある。このためには *S. enteritidis* は Dulcitol を24時間以内に分解するが *S. blegdam* Bl_3 S株は24時間以内には分解しないという性質を利用して、乳糖の代りに Dulcitol を加えた遠藤培地或いは Drigalski 變法培地を用いて両者を鑑別分離培養し、また血清学的にこれを確める様にした。

3. *S. rostock* S型生菌免疫実験

この場合もまず予めR型生菌免疫を以て免疫しておいてからS型生菌を以て免疫したのであるが、*S. rostock* 自体のR型菌がなかつたので、その代りに *S. dublin* のR型菌、65R₁株を用いた。即ち65R₁株生菌 10^{-3} mgをマウス腹腔内に接種し、14日後 *S. rostock* S型生菌 10^{-6} mgを腹腔内接種して生菌免疫とした。*S. rostock* S型生菌を接種したマウスの一部は斃死し、生残つた11頭にS型生菌接種後17日後に、 $Bl_3 S_8$ 株2mgを経口投與、攻撃した。攻撃後1頭が事故死したので残り10頭の成績を第1図に示した。対照12頭は4日乃至14日の間に全部死亡しているが *S. rostock* 免疫群は5頭生残つた。攻撃後30日目にこれを屠殺して滞菌状態をしらべたのが第3表のマウス6627乃至6631である。6627を除き他はすべて何れかの臓器に攻撃菌を保有しており、この場合にも総体的には攻撃菌の体内侵入阻止は認められないといえよう。

なお菌検索に当つては *S. rostock*, *S. dublin* は Arabinose を分解せず、*S. blegdam* は24時間以内に分解す

第 1 図



第3表 S型生菌免疫群生残マウスにおける培養検査成績

| 免疫原 | マウス番号 | 培養 | | | | | | |
|------------------------------|-------|----|---|---|---|---|---|---------|
| | | 心 | 血 | 肺 | 肝 | 脾 | 腎 | 腸間膜リンパ節 |
| 64R ₁ ↓ 64S | 6432 | — | — | — | + | + | ⊖ | + |
| | 33 | — | — | + | ⊕ | + | + | ⊕ |
| | 34 | — | — | ⊖ | ⊕ | + | ⊕ | + |
| | 35 | — | — | ⊕ | ⊕ | + | ⊕ | + |
| 65R ₁ ↓ 66S | 6627 | — | — | — | ⊗ | ⊗ | ⊖ | ⊖ |
| | 28 | — | — | ⊕ | ⊖ | ⊖ | ⊖ | ⊖ |
| | 29 | + | — | ⊕ | + | + | + | + |
| | 30 | — | — | ⊕ | ⊕ | + | + | + |
| 86S | 8644 | — | — | ⊖ | ⊖ | ⊖ | ⊖ | ⊖ |
| | 45 | — | — | ⊕ | + | + | ⊕ | + |
| | 46 | — | — | + | + | + | + | + |
| | 47 | — | — | ⊕ | ⊕ | + | ⊕ | + |
| 9S | 9014 | — | — | — | + | + | — | + |
| | 15 | — | — | — | — | + | — | ⊕ |
| 84S | 8450 | — | — | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊖ | ⊕ |
| | 51 | — | — | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊖ | ⊕ |
| | 52 | — | — | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊖ | ⊕ |
| | 53 | — | — | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊖ | ⊕ |
| 84S | 54 | — | — | + | ⊕ | ⊕ | ⊖ | + |

註 64S = *S. enteritidis* 1891 S型生菌66S = *S. rostock* S型生菌86S = *S. new-brunswick* 5411 S型生菌9S = *S. typhi murium* 1406 S型生菌84S = *S. newington* C₂ S型生菌

培養に関する記号は第2表に同じ。

るという性質の差異を利用して、乳糖の代りに *Arabinose* を加えた遠藤培地或いは *Drigalski* 變法培地を用いて免疫用菌株と攻撃用菌株とを鑑別分離培養し、血清学的にこれを確かめるという方法をとつた。

4. *S. new-brunswick* S型生菌免疫実験

S. dublin, *S. enteritidis*, *S. rostock* 何れの場合にも予め R 型生菌免疫を施しておいてしかる後 S 型生菌免疫を施したが、これは何れの菌株も始めから S 型を用いると極めて少量の菌を用いない限りマウスが斃死するおそれがあり、しかも余り少量では免疫効果があがるかどうかという疑問も一方にはあつたので、とられた処置であつた。S 型生菌はかなり長くマウスの体内にとどまつているであろうことは前報¹⁾の実験成績或いは本報でも攻撃菌株が 30 日後になおマウス体内に証明される事実から推察に難くない処であり、殊に攻撃後比較的早い時期に屠殺した *S. dublin* の例では大多数のマウスから免疫に用いた菌株も証明されたことはこの考えの誤りでないことを裏付けるものであろう。従つて免疫原としての役割を果して居るであろうと推察されるのであるが、強いて疑えば予め存在する R 型生菌免疫のはたらきによつて S 型菌の増殖は抑制されるわけであるから、S 型生菌としての免疫原性はそれほど発揮されていないかも知れないという懸念もないわけではない。すると最初から S 型生菌免疫を施してみる必要もある。この意味で最初から S 型生菌を用いて免疫して見たのが *S. new-brunswick*, *S. typhi murium*, 及び *S. newington* である。

S. new-brunswick 5411 株は小原の報告⁸⁾にもある様に 10^{-3} mg 以下の腹腔内接種ではマウスは死なない。そこで 10^{-3} mg を 1 回マウス腹腔内に接種し 17 日後に Bl_3 S 株 2 mg を経口投與攻撃した。その成績は第 1 図に示すとおりで、対照は前述のとおりであるが、免疫群は攻撃をうけた 17 頭の中 5 頭は 30 日後まで生残つた。生残マウスは攻撃後 30 日目に屠殺してその滞菌状態をしらべたが、その成績は第 3 表のマウス 8644~8648 であつて、8644 を除き他の 4 頭からはすべて攻撃菌が証明された。いいかえればこの場合にも攻撃菌の体内侵入は阻止されなかつたとみのが妥当と思われる。なお菌検索には *S. new-brunswick* は *Inositol* を分解するが、*S. blegdam* は分解しないという点を利用して乳糖の代りに *Inositol* を加えた遠藤培地或いは *Drigalski* 變法培地を用いて両者の鑑別分離培養を行い、血清学的にそれを確かめるという方法をとつた。

5. *S. typhi murium* 生菌免疫実験

S. typhi murium 1406 株 10^{-7} mg をマウス腹腔内接種して生菌免疫とし 14 日後に Bl_3 S 株 2 mg 経口投與、攻撃した。

この成績も第 1 図、第 3 表に示してある。対照マウスは 6 日乃至 11 日の間にすべて感染死したのに対し、*S. typhi murium* 生菌接種群は 15 頭中 13 頭が 8 日乃至 16 日の間に感染死して 2 頭が生残つた。生残マウスを 30 日後屠殺して保菌状態をしらべた成績が第 4 表 9014 及び 9015 に示す成績である。即ちどちらのマウスからも攻撃菌が証明されたのであつて、この例でも攻撃菌の体内侵入阻止は認められなかつた。ここで問題になるのは、*S. typhi murium* S 型生菌免疫で一体免疫が出来ていたかどうかであつて、かなり多数が死亡しているので感染防禦力は十分ではなかつたと認めなければならない。2/15 という生残率はかなり低いものであつて、この時用いた対照マウス 10 頭だけを対照として推計学的に無相関検定法で比較すると、 $p > 0.349$ となり、有意の差ありとはいえないことになる。しかしわれわれのこれまでの経験によると従来対照に用いたマウスは全部死亡し、その数は 90 頭に達する。(これはこの実験当時までの数字で現在では 100 頭以上に達する)。そこで 90 頭を対照において検討すると $P = 0.0192$ となり 2% の危険率を以て有意の差を認め得る。多数回時期を異にして、とられた対照群 (その他の条件は同じ) が皆同一成績であるから、1 度に多数の対照をおけば当然皆死亡するであろうと予想される。そしてこの予想には無理はないと考えられる。ただそうすることは時間、労力及び費用の上から不経済なものでとらないまでである。従つて従来対照 (同一条件のもの) を合せた 90 頭を対照にして比較しても許容されることと思う。そしてこの様な比較をしてみると 2% の危険率で感染防禦があつたと判定されるわけであるが、はつきりした断定は差控えることにしよう。

6. *S. newington* 生菌免疫実験

S. newington C_2 株は小原の報告⁸⁾にある様に 10^{-3} mg 以下の腹腔内接種ではマウスは死なないが、 10^{-2} mg では一部が死ぬ。そこで 10^{-2} mg を 1 回マウス腹腔内に接種し、20 日後に Bl_3 S 株 2 mg を経口投與攻撃した。(免疫処理による犠牲は 19 頭中 5 頭)。その成績は第 1 図に示す通りで対照 10 頭はすべて 14 日以内に感染死亡したが、免疫群は 14 頭中 5 頭が 30 日後までも生残つた。生残りマウスを攻撃後 30 日目撲殺して、その保菌状態をしらべたのが第 3 表のマウス 8450~8454 であつてすべてのマウスにおいて何れかの臓器から攻撃菌が証明された。即ち免疫は確かに認められるが攻撃菌の侵入は阻止されなかつたと見られる。

なお菌検索には乳糖の代りに *Dulcitol* を加えた遠藤培地或いは *Drigalski* 變法培地を用いた。*Dulcitol* を *S. newington* は 24 時間以内に分解するが、*S. blegdam* Bl_3 S 株は 24 時間以内には分解しないからである。

IV 総括並びに考按

前報においてわれわれは *S. blegdam* によるマウスのチフス性疾患は R 型生菌免疫によると比較的容易にかつ確実に賦與されるが、死菌ワクチンを以てしては死期の延長は認められても、感染死を防ぐことが出来なかつたことを報じた。

それならば死菌或いはその他の生菌を含めぬワクチンを以てしてはチフス性疾患に対する完全な感染防禦力—R 型生菌免疫によつて與えられるが如き—を與えることが出来ないものであろうか？

従來の文献の中にもチフス性疾患を起す菌對動物の實驗で死菌ワクチンにも若干の感染防禦力を認めている報告もある⁹⁾。ではこの様に死菌ワクチンの無効、有効のわかれるのはワクチンの作り方、接種方法の差異によるのであろうか？ そうばかりでもない様である。

著者の 1 人小池は「*S. blegdam* 對海狸」の實驗¹⁰⁾において毒力が比較的弱い場合には死菌免疫で明かに発症が抑制される事実を観察している。海狸は *S. blegdam* 2~4 mg 経口投與により殆んど全部発症するけれどもマウスと異り死亡は約 20 % に過ぎない。換言すればマウスに対するよりも毒力が相対的に弱いと見てよい。上の事實は毒力が相対的に弱い場合には死菌免疫でもある程度の効果を發揮し得ることを暗示する様に思われる。そこで従來死菌免疫に効を認めている様な場合には毒力が比較的弱いのではないだろうか、と考えてそれ等の文献について毒力をしらべてみたのが第 4 表であつて Lange u. Kauffmann (1933) の報告を除くと他はすべて相対的に菌の毒力が弱いと見られる。(第 4 表参照) いいかえれば相対的に毒力

の弱い場合にはチフス性疾患に対して死菌ワクチンでも効を發揮し得ると判断される。このことはチフス性疾患の免疫を論ずる場合にはただ單に確實な致死量を用いるとか、最少致死量の何倍量を用いるとかで相互のデータを比較すると判断を誤るおそれがあることを警告するものであろう。たとえ確實な致死量を用いて攻撃するとも、菌数が多量を要する場合(毒力が相対的に弱い爲)には死菌ワクチンでも効を表し得るが、致死量は同じでも菌数が少量で足りる場合(毒力が強い場合)には死菌ワクチンが効を發揮し難いと考えられる。

この様に考えることによつて従來の多数の文献の中で死菌免疫の効果を認めるものもあり認めぬものもある食違には一應解釈がつくと思う。(勿論ワクチンの作り方とか接種方法とかの差異に基づく場合もあるであろうが、その様な差異を除外して考えても)。

以上の例は何れもワクチンとしては大体似たりよつたりのものを用いている場合ばかりであるが、この外に特殊のワクチンとして、しかも最近発表されたものとして TAT 或いは TTT ワクチン(細谷教授³⁾)及びクロームワクチン(安東教授¹¹⁾)がある。クロームワクチンについては安東教授よりワクチンをいただいて現在追試中であつて、何れ報告することになると思うが、本報告の實驗の行われた頃はまだクロームワクチンは現われていなかったものであつて、従つて細谷教授の TAT ワクチンだけが追試されたのである。

TAT ワクチン或いは肝 TAT ワクチン或いは TAT ワクチンに準じて作られた明礬菌体ワクチン、64R₁ 明礬菌体ワクチン、B₁R₄ 明礬菌体ワクチンによる感染防禦試験は第 1 表に示したと

9) Kutscher u. Meinicke: Z. Hyg., 52, 301 (1906); Webster: J. exp. Med., 36, 71 (1922); Ibid., 37, 231 (1923); Pritchett, I. W.: Ibid., 39, 265 (1924); Lange, B. u. Yoshioka, M.: Z. Hyg., 101, 451 (1924); Ibrahim, H. M. u. Schütze, M.: Brit. J. exp. Path., 9, 353 (1928); Schütze, M.: Ibid., 11, 34 (1930); Greenwood, M. Topley, W. W. C. & Wilson, J.: J. Hyg., 31, 257 (1931); Lange, B. u. Kauffmann, F.: Z. Hyg., 115, 110 (1933); 原田: 千葉医會誌, 11, 1438 (昭 8); 野口: 細菌誌, 52 (昭 9); 越智: 同誌, 455, 36 (昭 9); 岸上: 海軍々医會誌, 25, 1 (昭 11);

井手: 細菌誌, 147 (昭 11); 黒川: 同誌, 34, 95 (昭 14); 石川: 日医大誌, 13, 6 (昭 17); 相川: 千葉医會誌, 21, 998 (昭 18)。

10) 小池: 第 3 回日本細菌学会北海道支部会演説 (昭 26 年 3 月); 第 24 回日本細菌学会総会演説 (昭 26 年 4 月); 第 27 回北海道医学会大会演説 (昭 26 年 6 月)。

原著近日掲載予定。

植竹: 第 7 回日本公衆衛生学会シンポジウム演説 (昭 27 年 8 月); 第 5 回日本細菌学会北海道支部会シンポジウム演説 (昭 27 年 9 月)。

11) 安東: 医学通信, 7 (284-289) (昭 27)。

第4表 死菌免疫の効果を認める報告

| 報告者 | 年 | 菌型 | 動物 | Vaccine | M. L. D. | 攻撃 | 批判 | |
|----------------------------|------|------------------|-----|-----------------------------|--|--|------------------|----------|
| | | | | | | | 毒力 | 其他 |
| Kutscher u. Meinicke | 1906 | MT | 海 豚 | 60°C 2 h 皮下 | i. p. 10^{-3} öse 皮下 $1/2$ öse | i. p. 10 MLD 1,000 MLD 100,000 MLD | | 例数 少い |
| Webster | 1922 | MT | マウス | 55°C 2 h | i. p. $> \frac{\text{broth}}{5000}$ 経口 $> \frac{\text{broth}}{100}$ | i. p.) 種々の量 経口 | 弱 い | |
| Pritchett | 1923 | MT | マウス | 60°C 1 h 56°C 1 h | | 経 口 | 弱 い 対照 < 100% | |
| Lange u. Yoshioka | 1924 | MT | マウス | クロロホルム 死 菌 | 皮下 10^{-8} mg 経 口 (1/10 ~ 1 öse) 不規則 | 10^{-8} mg 皮下 経口 2 öse | | 例数 少い |
| Ibrahim u. Schütze | 1928 | MT | マウス | 加熱皮下 | i. p. $\frac{10^{-5}}{2}$ mg | i. p. 500 MLD | 弱 い | |
| Schütze | 1930 | MT | マウス | 加熱皮下 クロロホルム 皮 下 | i. p. $\frac{10^{-5}}{2}$ mg | i. p. 500 MLD | | |
| Greenwood, Topley & Wilson | 1931 | MT | マウス | フオルマリン 処 理 後 50°C 1 h | (i. p. 1000 ケ)? | i. p. 1000 ケ | 弱 い | |
| Lange u. Kauffman | 1933 | MT | マウス | 55 ~ 58°C 2½ h | i. p. 10^{-9} ~ 10^{-10} öse | | 強 い | |
| 原 田 | 1933 | G (B) | マウス | 加熱経口 皮下 | i. p. 10^{-7} mg (9/10) 経口 0.5 mg | i. p. 10^{-6} mg 経口 0.5 ~ 4 mg | 弱 い | |
| 野 口 | 1934 | G (B) | 白 鼠 | 60°C 30分 | 10^{-2} mg | | 弱 い | |
| 越 智 | 1934 | 馬 産 流 菌 | マウス | 50 ~ 58°C | i. p. 10^{-2} ~ 10^{-3} mg 経口 2 mg (90%) | i. p. 種々の量 経口 2 mg | 弱 い | |
| 岸 上 | 1936 | MT | マウス | 60°C 1 h | i. p. $> 10^{-4}$ mg | i. p. 経口 | 弱 い | |
| 井 手 | 1936 | MT | マウス | 60°C 1 h | i. p. 10^{-5} ~ 10^{-7} mg 経口 > 2 mg | i. p. 10^{-5} mg 経口 2 mg | 弱 い | |
| 黒 川 | 1939 | MT (井手 分離) | マウス | 60°C 40 ~ 60分 | i. p. 10^{-4} mg | i. p. 10^{-1} ~ 10^{-3} mg | 弱 い | |
| 石 川 | 1942 | MT G | マウス | 60°C 30分 | i. p. 10^{-6} mg | i. p. 10^{-6} mg | 弱 い | |
| 相 川 | 1943 | MT | マウス | 加熱皮下 | i. p. 10^{-7} mg | 経口 | 対照 < 100% | |

註 1) 菌型欄

MT: *S. typhi murium*G: *S. enteritidis*G (B): *S. enteritidis* の B 株

2) M. L. D. 欄

(9/10) は 10 頭中 9 頭感染死の意

(90%) は 90% が感染死の意

3) 毒力欄

対照 < 100% は対照が 100% 感染死しないの意

おりで TAT ワクチン免疫群で極めて少数の生残りを示す程度の成績しか得られなかつた。この成績は前報では死菌免疫群が全部感染死したのに比べるとたとえ少数でも生残りが出たということは百尺竿頭一步を進めたといえるであろうが、対照群との差の有意性については前項で指摘した様にいわば境界線のデータで、はつきりした発言をするには更に実験を必要とする。同じワクチンを用いてこの実験を繰返してもよりよい成績は得られなかつた。従つてわれわれの作ったワクチンは出来るだけ細谷教授の記載どおりに操作したのであるが余りよいワクチンではなかつたのかも知れない。ワクチンの作製は、殊に特殊のものの作製には熟練と技術を要する筈である。この様な問題は細谷教授に直接 *Bl₃* S 株を用いてワクチンを作つていただくのが一番よいわけであるが、幸にして抗原抗体班の総合研究協議會においてこの問題がとりあげられ、細谷教授の処でワクチンを作製して下さることになつたのは非常に感謝に堪えない。ワクチンが出来てその実験成績が得られた場合再び更めて報告することになると思うのでそれまでははつきりした結論は保留し一應これまでのデータを示すにとどめておきたい。

次は攻撃菌の体内侵入阻止の問題である。TAT 或いは TTT 二免疫により攻撃菌の体内侵入が阻止されると細谷教授等³⁾は報告している。R 型生菌免疫では攻撃菌の体内侵入は阻止出来ないが、侵入した菌の増殖が抑制されると考えられる (小林教授等²⁾ 及び著者等¹⁾)。すると両者の機轉が異なることを意味するものであるから、非常に重大なことである。われわれの TAT ワクチンでは十分な感染防禦力が得られず従つて生残りマウスが少なく、攻撃菌の体内侵入阻止を論ずる根拠にはなし難く、しかもこの問題はワクチンの作り方にも関係した問題である。そこでわれわれは別のルートからこの問題を研究してみた。即ちもし両方の免疫機轉が両立するとすれば、S 型生菌を以て免疫すれば、両方の機轉が認められてよい筈である、との考えの下に S 型生菌免疫を興えてみた。ただ S 型生菌免疫実験を行うのに都合の悪いことは免疫用菌株として攻撃と同一の菌株を用いられな

い点である。(鑑別がつけられないから)。しかし heterologous *Salmonella* を用いても免疫を興えることが出来ることが前報¹⁾ で知られているので、S 型生菌として heterologous *Salmonella* を用いてみた。

使用菌種は *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. rostock*, *S. typhi murium*, *S. new-brunswick*, *S. newington* であつて、前三者では先ず R 型生菌免疫を施してから S 型生菌免疫を、後三者では直接 S 型生菌を以て免疫を施し、これ等に *Bl₃* S 株を経口投與攻撃した。

その成績は第 1 圖、第 3 表の如くで、結局攻撃菌の体内侵入を阻止するとは認められなかつた。

それではどう考えたらいいであろうか?

1) われわれの実験で攻撃に用いた菌量が多過ぎたのであろうか?

2) heterologous *Salmonella* を用いたためであろうか?

3) 使用した菌株、マウスの系統が両者異なるためであろうか?

4) 実験成績に対する解釈のちがひがあるのでしょうか?

(1) の点については細谷教授等がゲルトネル菌を用いてわれわれと同様に経口攻撃した実験の報告があるので一應除外しておこう。

(2) の点については何ともはつきりしたことは今のところいえない。主観がゆるされるならば余り可能性はありそうにもない様に思われる。

(3) の点についても今の処何ともいえない。

(4) の点はどうであろう。細谷教授等の示すゲルトネル菌についての実験データの解釈に対しては別の解釈も出来そうに思われるのである。即ち攻撃後日を追うてマウスを屠殺、培養してゆくと 10 日目頃までは免疫群でも攻撃菌が証明されるが 13 日以後は証明されなくなつていく。このデータは侵入した菌が比較的速かに殺されてしまうと解釈するか (勿論このデータだけの解釈) 或いは少なくとも侵入阻止の外に殺菌の機轉を考えた方がいいのではなからうか? もしも侵入を阻止するだけ (殺菌の機轉はなく? 侵入後は増殖抑制—R 型生菌免疫で証明済み—だけとする) なら任意

にとり出して殺したマウスからの菌の証明はかなり不規則に分布されてもよい筈であつて、10日以前にのみ偏ることはむしろおかしくはないだろうか？この偏りが偶然でないとするれば侵入後とも角も速かに処理—殺菌されてしまうことを暗示することにならないだろうか？

しかしその様に殺菌作用と解釈するにしても *S* 型生菌免疫ではその様な機轉は認められないのであつて、やはり現在の処すべてのデータに筋をとおしてうまく説明をつけるわけにはいかない。

要するに TAT 或いは TTT ワクチンにより攻撃菌の体内侵入が阻止されるか否かという点、殺菌作用もあるのかどうかという点にもなお未解決の問題が残されており、更に研究を必要とするものと考えられる。

なお附隨的ではあるが *S* 型生菌免疫の実験で *S. enteritidis*, *S. dublin* 及び *S. rostock* においては *R* 型生菌免疫を施しておいてから *S* 型菌を接種(確実に無処理マウスを斃す量)したのであるから *R* 型生菌免疫によりチフス性疾患に対する免疫が成立することが、再び認められたといえよう。

また、*S* 型生菌免疫原としては本報告に挙げた菌種の外更に数種の菌種についても類似の実験を

行つており、その成績も同様であつたが、原稿枚数制限のため本報に載せることが出来ないので別報として報告する予定であることを附記する。

V 結 論

1. 細谷教授のいわゆる TAT ワクチンを Bl_3S 株から作製してマウスを用いて感染防禦試験を行つた結果、生存日数延長を認め、かつ最もよい成績を示した場合には 16 頭中 2 頭が 30 日後まで生残つた。

またこの成績の暗示する点について討論を加えた。

2. *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. rostock*, *S. typhimurium*, *S. new-brunswick*, *S. newington* の *S* 型生菌を以てマウスを免疫し、これに Bl_3S 株を経口投与攻撃した。 Bl_3S 株の感染は防禦され、マウスの致命率は低下するが、生残つたマウスでも何れかの臓器から攻撃菌が証明されるから、攻撃菌の体内侵入が阻止されるものではなくて、体内での菌の増殖が抑制されるのであると解釈される。

(拙筆に当り本研究に多大の御援助を載いておる傳染病研究所細谷教授に深甚の謝意を表する。)

Summary

The so-called "T. A. T." vaccine and several similar vaccines were prepared with Bl_3S strain of *S. blegdam* by the procedures described by Hosoya and his associates. After inoculation with these vaccines mice were challenged orally with 2 mg of Bl_3S strain, which were sufficient to kill all the non-treated mice within fourteen days. The protective effects of these vaccines were not as remarkable as reported by Hosoya and others, and even in the best protected group only two of sixteen mice survived thirty days after challenge. As the procedure of preparing vaccines requires skillful technique, it should be borne in mind that the above results might be due to the technique of preparing vaccines. Several additional points suggested by these experimental results were discussed.

The "T. A. T." vaccine and others described above, which did not contain any living organism were unable to confer to mice enough protection from infection with Bl_3S strain of *S. blegdam*. And the mechanism as suggested by Hosoya, i. e., that the invasion of challenge bacilli might be suppressed in mice immunized with "T. A. T." vaccines, could not be observed.

Then the authors attempted to confirm the said mechanism from other standpoints. Thus, mice were vaccinated by smooth living organisms of *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. rostock*, *S. typhimurium*, *S. new-brunswick* and *S. newington* and challenged orally with Bl_3S strain. The vaccinated mice were protected from infection with *S. blegdam* and the death rate reduced obviously.

But as challenge organisms were recovered from the organs of the survivors which were killed thirty days after challenge, it is suggested that the mechanism of this immunity lies neither in the suppressive effect on the invasion of challenge bacilli nor in a bactericidal effect but in a suppressive effect on multiplication of invading bacilli.
